

刘文健, 王帅雯, 吉梅, 等. 禽腺病毒 4 型 Fiber-2 蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 101-109.

LIU W J, WANG S W, JI M, et al. Preparation of monoclonal antibody against fowl adenovirus serotype 4 Fiber-2 protein and establishment of the double antibody sandwich ELISA method [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 101-109.

禽腺病毒 4 型 Fiber-2 蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

刘文健¹, 王帅雯¹, 吉梅², 刘萌¹, 汤智辉¹, 张硕¹, 宋素泉¹, 闫丽萍^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 中海生物制药(泰州)有限公司, 江苏 泰州 225316)

摘要: 旨在制备禽腺病毒 4 型 (FAcV-4) Fiber-2 蛋白的单克隆抗体并建立 Fiber-2 蛋白的定量检测方法。本研究将原核表达的 Fiber-2 蛋白免疫 BALB/c 雌鼠, 通过细胞融合技术制备杂交瘤细胞, 并通过免疫印迹、间接免疫荧光和抗体相加试验筛选杂交瘤细胞株; 以制备的单克隆抗体为捕获抗体和酶标检测抗体, 通过优化捕获抗体包被浓度和酶标抗体稀释度等条件, 建立特异性检测 Fiber-2 蛋白的双抗体夹心 ELISA 方法。结果: 本研究成功筛选到 3 株能够稳定传代的杂交瘤细胞株 1H2、2A9 和 3E1, 其分泌的抗体均与 FAcV-4 全病毒具有良好的反应性, 可识别不同抗原表位; 进一步发现, 以 1H2 为捕获抗体、2A9 为酶标检测抗体, 能够建立检测 Fiber-2 蛋白的 ELISA 方法; 该方法具有良好的重复性, 批内重复及批间重复试验变异系数均小于 10%; 敏感性高, Fiber-2 蛋白检测限为 0.078 ng/ μ L; 特异性好, 不与 FAcV-4 的其他结构蛋白及鸭腺病毒 3 型的 Fiber-2 蛋白发生反应。综上, 本研究成功制备了 3 株 Fiber-2 蛋白单克隆抗体, 并建立了定量检测 Fiber-2 蛋白的双抗体夹心 ELISA 方法, 为后续 FAcV-4 基础研究和 Fiber-2 亚单位疫苗研究奠定了物质基础。

关键词: 禽腺病毒血清 4 型; 单克隆抗体; 双抗体夹心 ELISA

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)06-0101-09

Preparation of monoclonal antibody against fowl adenovirus serotype 4 Fiber-2 protein and establishment of the double antibody sandwich ELISA method

LIU Wenjian¹, WANG Shuaiwen¹, JI Mei², LIU Meng¹, TANG Zhihui¹, ZHANG Shuo¹,
SONG Suquan¹, YAN Liping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Zhonghai Biopharmaceutical (Taizhou) Co., Ltd., Taizhou 225316, China)

Abstract: This research aimed to prepare a monoclonal antibody for FAcV-4 Fiber 2 protein and to establish a specific quantitative detection method for Fiber-2 protein. FAcV-4 Fiber-2 protein expressed in a prokaryotic system was firstly used to immunize 6-week-old BALB/c female mice, and spleen cell fusion was performed to prepare hybridoma cells. The prepared hybridoma cells were further screened in this study via western blotting assay, indirect immunofluorescence assay, and antibody addition experiments. Next by optimizing a series of conditions such as the concentration of the captured antibody coating and the dilution of the enzyme-labeled antibody, a dual-antibody sandwich ELISA method capable of specifically detecting the concentration of Fiber-2 protein could be established. Finally, the prepared monoclonal antibody was used as the capture antibody and the enzyme-labeled detection antibody in this detection method. The results showed that three hybridoma cell lines named 1H2, 2A9 and 3E1 were successfully prepared in this study, and the monoclonal antibodies secreted by them reacted well with FAcV-4 and could recognize different antigenic epitopes. Further studies revealed that an ELISA method for the detection of Fiber-2 protein could be established using 1H2 as the capture antibody and 2A9 as the enzyme-labeled detection antibody. The double antibody sandwich ELISA method prepared based on the above monoclonal antibodies possessed good repeatability, and the coefficient of variation of repeated experiments within and between batches was below 10%. At the same time, the detection limit of Fiber-2 protein

收稿日期: 2024-01-20; 修回日期: 2024-04-16

基金项目: 泰州市“接榜挂帅”重点科技项目 (JBCS202103)

第一作者: 刘文健, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 闫丽萍, 教授, 主要从事动物重要疫病致病机理、诊断及基因工程疫苗方面的研究, E-mail: yanliping@njau.edu.cn。

in this method was only 0.078 ng/ μ L, and it did not react with other structural proteins of FAdV-4 and Fiber-2 proteins of DAdV-3. Conclusively, three monoclonal antibodies against Fiber-2 protein recognizing different epitopes were successfully prepared in this study, and a double-antibody sandwich ELISA method was successfully established to quantitatively detect the concentration of fiber-2 protein, which would serve as a good material foundation for basic research on FAdV-4 and research on Fiber-2 subunit vaccine in the future.

Keywords: fowl adenovirus serotype 4; monoclonal antibody; double antibody sandwich ELISA

禽腺病毒 (fowl adenovirus, FAdV) 属于腺病毒科禽腺病毒属, 根据其群特异性抗原差异, 禽腺病毒可以分为 I、II、III 群, 根据血清交叉中和试验结果和限制性酶切图谱, I 群禽腺病毒又被分为 1~8a、8b~11 共计 12 种血清型, A~E 共计 5 个基因型^[1-2], 不同基因型的 FAdV 可引起不同致病特征^[3-6]。禽腺病毒血清 4 型 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 属 FAdV-C, 主要导致 3~5 周龄肉鸡发生心包积液-肝炎综合征 (hydropericardium - hepatitis syndrome, HHS), 病死鸡剖检可见肝脏黄染、易碎, 心包膜内有稻草色澄清透明积液^[7]。自 2015 年以来, FAdV-4 在我国养禽业较为发达的省份广泛流行, 并逐渐成为优势流行血清型, 致死率可高达 80%, 并可垂直传播和水平传播^[8]。

FAdV-4 为无囊膜双链 DNA 病毒, 基因组大小约 45 kb^[9]。病毒粒子直径大小为 79~90 nm^[10], 病毒衣壳主要由 Hexon 蛋白、Penton base 蛋白和长短不一的 2 个 Fiber 蛋白组成, 此外还包括各种次要结构蛋白和非结构蛋白^[11-12]。Hexon 蛋白是构成病毒衣壳的主要结构蛋白, 该蛋白包含中和表位和主要的特异性抗原决定簇, 是禽腺病毒遗传进化分析的靶基因, 其在病毒复制中也起到了重要作用^[12-15]。Penton base 蛋白主要作为 Fiber 蛋白的基座, 通过非共价形式与 Fiber 蛋白连接使得其展示在病毒粒子表面, 同时参与病毒对靶细胞的入侵和二次附着^[16-17]。Fiber 蛋白主要分为头区、轴区和 N 端的尾区^[18]。禽腺病毒血清 4 型的 Fiber 蛋白分为较长的 Fiber-2 蛋白 (479 个氨基酸) 和较短的 Fiber-1 蛋白 (431 个氨基酸)^[19]。Fiber-1 蛋白的头区在 FAdV-4 的细胞入侵中起到重要作用^[20]。Fiber-2 蛋白是 FAdV-4 另一重要的毒力决定因素, 能够引起 HHS 的 FAdV-4 毒株与非致病 FAdV-4 毒株的 Fiber-2 蛋白氨基酸序列存在多处差异^[3]。Xie 等^[21] 研究发现, Fiber-2 蛋白 1~40 位氨基酸区域可以与宿主蛋白 KPNA 3/4 互作, 介导病毒在宿主细胞内的复制。值得注意的是, 虽然 Fiber-2 蛋白不能诱导机体产生中和抗体, 但其却表现出良好的免疫保护作用, 多数针对 FAdV-4 的亚单位疫苗的研究均围绕 Fiber-2 蛋白展开^[22-26], 最小免疫剂量最低可达 2.5 μ g/羽^[24]。Xie 等^[27] 还通过 CRISPR/Cas9 技术将高致病力 FAdV-4 毒株的

Fiber-2 蛋白替换为 EGFP 蛋白, 进而研制了可以提供良好保护作用的减毒 FAdV-4 活疫苗。此外, 利用针对 Fiber-2 蛋白的单克隆抗体建立的胶体金检测试纸条及双抗体夹心 ELISA 方法在 FAdV-4 病原检测中也有着广泛应用^[28-29]。综上, Fiber-2 是 FAdV-4 分子致病机制、防控手段及检测产品研究的重要靶蛋白。

本研究以原核表达的 Fiber-2 蛋白为免疫原免疫 BALB/c 雌鼠, 经细胞融合后制备了杂交瘤细胞, 并通过一系列筛选最终获得了能够连续传代、稳定分泌单克隆抗体的 3 株阳性杂交瘤细胞 1H2、2A9、3E1, 其分泌的单克隆抗体具有良好的反应性并能识别 Fiber-2 蛋白的不同抗原表位。随后, 本研究以 1H2 为捕获单抗, 以 HRP-2A9 为酶标抗体成功建立了可以检测 Fiber-2 蛋白的双抗体夹心 ELISA 方法, 为后续研究 Fiber-2 亚单位疫苗提供了良好的蛋白浓度定量工具, 也为深入研究 FAdV-4 致病机制提供了物质基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

BALB/c 小鼠购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司; SP2/0 细胞及能够表达 FAdV-4 JS 株 Fiber-2 蛋白的相关菌种均由本实验室保存。免疫印迹分析 (Western blot), 间接免疫荧光分析 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 鉴定中使用的 FAdV-4 JS 株由本实验室分离保存^[30]。

50 \times HAT 添加剂、PEG2000、HEPES、无水乙酸钠、氯化钠及弗氏不完全佐剂均购于 Sigma 公司; 丙酮酸钠和 L-谷氨酰胺均购于上海蓝季科技发展有限公司; 0.4% 台盼蓝染色剂、细胞计数板购于赛默飞世尔科技有限公司; 异硫氰酸荧光素酯 (FITC) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠抗体购于 KPL 公司; IgG 免疫亲和层析柱、镍离子亲和层析柱均购于武汉汇研生物科技有限公司; 抗体酶标试剂盒购于湖州英创生物科技有限公司。

1.2 免疫原制备

将保存于 -80 $^{\circ}$ C 的 pET28a-Fiber-2-Rosetta 甘油菌复苏培养, 随后按照 1% 比例接入 200 mL 含卡那霉素的 LB 培养基, 培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 值在 0.4~0.6 时

加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 并转入 16 °C 120 r/min 诱导表达 16 h。诱导表达结束后离心收集菌体, 用含 50 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液重悬菌体进行超声破碎, Fiber-2 蛋白以可溶性形式表达于上清液中, 按照镍离子亲和层析柱说明书对 Fiber-2 蛋白进行纯化, His-Fiber-2 蛋白在 200 mmol/L 咪唑浓度下大量洗脱, 测定浓度及纯度后保存于 -40 °C 备用。

1.3 单克隆抗体的制备、纯化及鉴定

将前步制备的 His-Fiber-2 蛋白以兽用注射白油乳化, 水相与油相体积比为 1 : 2。将制备好的油乳剂疫苗免疫 6 周龄 BALB/c 雌鼠, 免疫剂量为 50 μg/只。首次免疫 21 d 后以相同剂量加强免疫 1 次, 2 次免疫 21 d 后将免疫剂量调整为 150 μg/只进行 3 次免疫; 3 次免疫 7 d 后断尾采血, 以包被原为 Fiber-2 蛋白 (包被浓度 2 μg/mL) 的间接 ELISA 方法检测血清抗体效价, 对血清效价高的小鼠进行加强免疫。加强免疫后 3 d 麻醉小鼠无痛处死, 无菌采集脾细胞, 利用 PEG2000 使得脾细胞与 SP2/0 细胞融合。

通过前述间接 ELISA 方法筛选能够分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞, 阴性对照为 SP2/0 细胞培养上清液, P/N 值为阳性 $OD_{450\text{nm}}$ 值/阴性对照 $OD_{450\text{nm}}$ 值的比值, P/N 值 > 2.1 时认为该孔为阳性。将阳性孔细胞吹下后, 进行细胞计数, 按照 100 个活细胞/孔加入提前铺设好饲养层细胞的 96 孔细胞板中进行亚克隆。通过 Western blot、IFA、体外中和试验及抗体相加试验筛选能够分泌特异性好、反应性好, 可以识别不同表位单克隆抗体的杂交瘤细胞, 并制备腹水抗体。相加试验步骤按参考文献 [31] 进行, 具体步骤如下: 将单抗 I、单抗 II 分别 100 μL 加入事先包被好的 2 μg/mL Fiber-2 蛋白的 ELISA 板中, 并测定对应的 $OD_{450\text{nm}}$ 值, 并记为 A_1 和 A_2 ; 后先加 100 μL 单抗 I 于上述 ELISA 板中, 37 °C 孵育 1 h, 洗板后加 100 μL 单抗 II, 37 °C 1 h 后测定对应的 $OD_{450\text{nm}}$ 值, 记为 A_{1+2} , 并按照如下公式计算相加指数 (AI), 即 $AI = \{ [2A_{1+2} / (A_1 + A_2)] - 1 \} \times 100\%$, 当 $AI > 50\%$ 时, 认为两单克隆抗体识别不同表位; $AI < 50\%$ 时, 认为两单克隆抗体识别表位相同或相似。参照 IgG 蛋白免疫亲和层析柱说明书对上述腹水抗体进行纯化, 参考抗体酶标试剂盒说明书对上述纯化后的腹水抗体进行酶标记。

1.4 双单抗夹心 ELISA 方法反应程序的确定

1.4.1 捕获单抗和检测单抗的配对筛选

将 1 μg/mL 腹水抗体 4 °C 过夜包被 ELISA 板, 0.1% PBST 洗涤 3 次后每孔以 300 μL 5% 脱脂奶

37 °C 封闭 2 h, 后 0.1% PBST 洗涤 3 次。封闭完成后每孔加入 1.5 μg 纯化 Fiber-2 蛋白, 37 °C 作用 1 h; 0.1% PBST 洗板 3 次后每孔加入 100 μL 5% 脱脂奶稀释 2 000 倍的酶标单抗, 37 °C 作用 45 min, 0.1% PBST 洗板 3 次后每孔加入 100 μL 现配的 TMB 显色液, 37 °C 避光反应 5 min, 最后每孔加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止显色后读取 $OD_{450\text{nm}}$ 值。选取 P/N 值最大的组合为最佳搭配。

1.4.2 包被条件筛选

将前步挑选的最佳捕获单抗以 5% 脱脂奶稀释至 2 μg/mL 包被 ELISA 板, 每孔 100 μL, 包被条件分别设置为 37 °C 2 h、37 °C 3 h、4 °C 包被 14 h, 后续封闭等步骤参考本文 1.4.1, 选取 P/N 值最大的包被条件为最佳包被条件。

1.4.3 捕获单抗和酶标检测单抗的最适浓度筛选

以 pH 值 9.6 的碳酸盐缓冲液将捕获单抗稀释为 1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL 和 8 μg/mL, 按照确定的最佳包被条件包被 ELISA 板; 以 5% 脱脂奶将酶标抗体分别按照 1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000、1 : 16 000、1 : 32 000 比例稀释, 通过方阵滴定试验确定最佳浓度组合, 选择 P 值最接近于 1, 且 P/N 值最大时的浓度组合为最佳浓度组合。具体 ELISA 程序参考本文 1.4.1。

1.4.4 Fiber-2 蛋白最佳作用时间筛选

按照前步摸索的捕获单抗最佳包被浓度和包被条件包被 ELISA 板, 封闭洗板后以 0.1% PBST 将 Fiber-2 蛋白稀释至 1.5 μg/孔, 分别于 37 °C 作用 30 min、45 min、1 h 及 1.5 h, 洗板后按照前步摸索的最佳酶标抗体稀释度稀释抗体, 每孔加入 100 μL, 后续步骤参考本文 1.4.1。

1.4.5 酶标单抗的最佳作用时间筛选

按照摸索的最佳条件进行 ELISA 试验, 加入最佳稀释度的酶标单抗后, 分别在 37 °C 作用 20 min、30 min、45 min、60 min, 并选取 P/N 值的最大时间为酶标单抗的最佳作用时间。

1.4.6 TMB 显色底物最佳反应时间筛选

按照摸索的最佳条件进行 ELISA 试验, 加入 TMB 显色液之后, 分别在 37 °C 显色 5 min、10 min 和 15 min, 选取 P/N 值最大的 TMB 显色底物作用时间为最佳作用时间。

1.5 双抗体夹心 ELISA 方法的敏感性试验

以 PBST 溶液将 Fiber-2 蛋白进行 2 倍倍比稀释, 起始稀释浓度为 2 μg/100 μL, 共设 10 个稀释度, 并以 SP2/0 细胞培养上清液作为阴性对照, 选择 P/N 值 > 2.1 时的最大稀释度为所建立的双抗体夹心 ELISA 方法的检测线。

1.6 双抗体夹心 ELISA 方法的特异性试验

按照前步试验确定的 ELISA 程序, 检测所建立的双抗体夹心 ELISA 方法是否可以和 FAdV-4 的 Fiber-1、Penton base、Hexon 蛋白及鸭腺病毒 3 型的 Fiber-2 蛋白发生非特异性反应, P/N 值 >2.1 时判为阳性, 以检测建立的 ELISA 方法的特异性。

1.7 双抗体夹心 ELISA 方法的重复性试验

选取同一批次包被 ELISA 板, 按照建立的 ELISA 程序进行 4 次批内重复试验, 分别记为试验 1~4, 每次试验共设置 6 个重复, 计算每次试验的平均值和标准差后计算变异系数。

共取 4 个批次包被的 ELISA 板, 捕获单抗包被浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$, 4°C 包被 12 h, 包被结束后 0.1% PBST 洗板 3 次, 以 5% 脱脂奶 37°C 封闭 2 h, 0.1% PBST 洗板 3 次后 -40°C 保存备用。按照建立的 ELISA 程序进行批间重复试验。在进行批间重复试验时, 每次试验都自不同批次包被的 ELISA 板随机选择 1 条酶标条, 即每次批间重复试验设置 4 个不同批次重复, 共进行 5 次批间重复试验, 分别记为试验 1~5, 计算每次试验的平均值和标准差后计算变异系数。

1.8 数据处理与分析

双抗体夹心 ELISA 方法反应程序确立中的部分数据及特异性试验数据由 GraphPad Prism 9.5.1 进行整理, 并以柱形图的形式展示; 敏感性试验中 Fiber-2 蛋白浓度和 $OD_{450\text{nm}}$ 值之间的线性回归方程由 GraphPad Prism 9.5.1 中的线性回归分析计算得到, 数据以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果

2.1 阳性杂交瘤细胞的筛选及效价测定

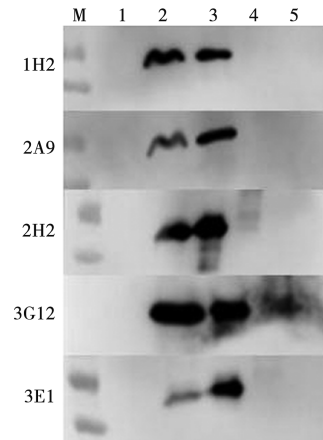
以 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ Fiber-2 蛋白为包被原的间接 ELISA 方法测定 3 次免疫后的小鼠血清抗体水平, 测得 3 只小鼠的血清抗体效价分别为 10^5 、 10^6 和 10^6 。选择血清抗体效价为 10^6 的小鼠进行加强免疫, 3 d 后进行细胞融合, 经过 4 次亚克隆筛选, 最终获得 5 株可以连续传代的阳性杂交瘤细胞株, 分别命名为 1H2、2A9、2H2、3E1 和 3G12。以 5% 脱脂乳对上述杂交瘤细胞培养上清进行 2 倍倍比稀释, 测得上述 5 株杂交瘤细胞上清液的抗体效价为 2^{10} 、 2^{12} 、 2^6 、 2^{12} 和 2^6 。

2.2 单克隆抗体的特异性鉴定及相加试验

2.2.1 Western blot 检测

分别以感染 FAdV-4 的 LMH 细胞培养产物、空白对照 LMH 细胞对照产物、纯化后的 FAdV-4 Fiber-2 蛋白、pET28a 空载体诱导产物及纯化后的鸭

腺病毒 3 型 Fiber-2 蛋白为待检样品, 以上述 5 株杂交瘤细胞培养上清为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠抗体为二抗进行 Western blot 检测。结果显示仅感染 FAdV-4 的 LMH 细胞培养产物和纯化后的 FAdV-4 Fiber-2 蛋白出现大小正确条带 (图 1), 证明 5 株杂交瘤细胞分泌单抗的特异性良好。



M. 蛋白 Marker; 1. 空白 LMH 细胞; 2. FAdV-4 感染的 LMH 细胞; 3. 纯化 FAdV-4 Fiber 2 蛋白; 4. pET28a 空载; 5. 纯化鸭腺病毒 3 型 Fiber 2 蛋白。

图 1 Western blot 验证单克隆抗体的特异性

2.2.2 IFA 检测

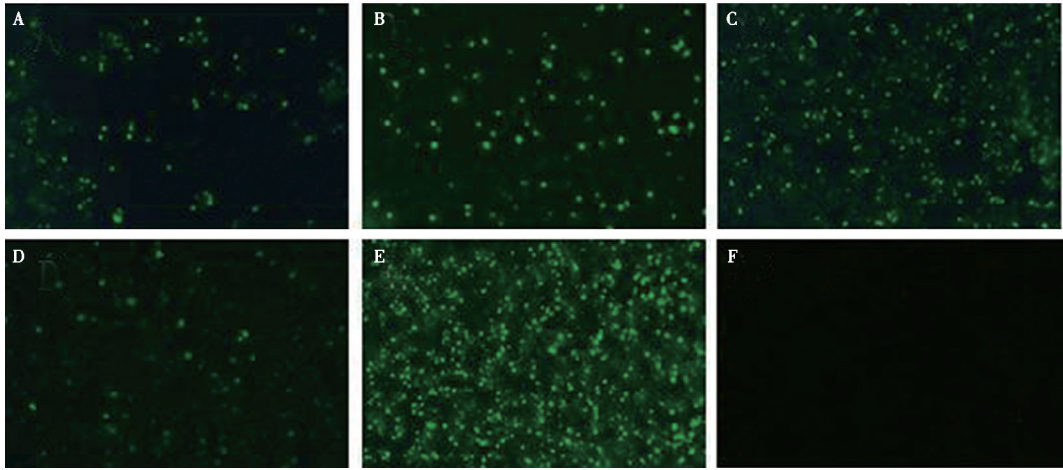
以 4% 多聚甲醛溶液对感染 FAdV-4 JS 株且产生典型细胞病变的 LMH 细胞进行固定, 封闭后孵育上述 5 株杂交瘤细胞分泌上清液, 0.1% PBST 清洗后孵育 FITC 标记的山羊抗鼠抗体, 以倒置荧光显微镜观察孔内荧光情况, 结果显示, 在感染 FAdV-4 JS 株 LMH 细胞孔中均可观察到荧光, 而阴性对照孔无荧光 (图 2), 证明 5 株杂交瘤细胞分泌单抗的特异性良好, 可作为 FAdV-4 IFA 检测的工具抗体。

2.2.3 体外中和和活性试验

将单抗杂交瘤细胞分泌上清液与 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 的 FAdV-4 JS 株病毒液混合, 并于 37°C 作用 1 h 后接种于 LMH 细胞。结果显示, 在接种 48 h 后细胞出现 FAdV-4 侵染细胞的典型病变, 证明上述 5 株杂交瘤细胞培养上清液中的单克隆抗体均无中和活性。

2.2.4 相加试验

当 2A9 作为单抗 I, 1H2、2H2 为单抗 II 时, AI 均大于 50% , 证明 2A9 和 1H2、2H2 识别不同表位; 当 3E1 作为单抗 I, 1H2、2A9 和 2H2 为单抗 II 时, AI 均大于 50% , 证明 3E1 和 1H2、2A9、2H2 识别不同表位 (表 1)。综上, 制备 1H2、2A9、3E1 这 3 株单克隆抗体之间可以识别不同抗原表位, 后续制备了上述 3 株单克隆抗体的腹水抗体。



A. 单抗 1H2; B. 单抗 2A9; C. 单抗 2H2; D. 单抗 3E1; E. 单抗 3G12; F. 未感染细胞对照。

图 2 IFA 验证单抗的特异性

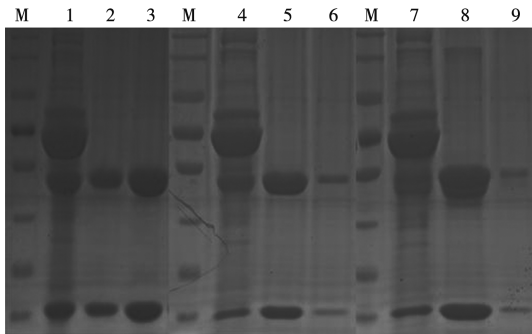
表 1 5 株单克隆抗体相加试验的 AI 结果 %

单抗 II	单抗 I				
	1H2	2A9	2H2	3E1	3G12
1H2	\	72	3	76	49
2A9	45	\	20	75	53
2H2	-	56	\	55	46
3E1	17	41	18	\	41
3G12	48	28	40	15	\

注：“-”表明最后算出的 AI 为负数，“\”表示无数值。

2.3 腹水抗体制备及效价测定

将 IgG 免疫亲和层析纯化的 1H2、2A9、3E1 腹水抗体以 PBS 5 倍稀释后进行 SDS-PAGE 验证纯度。结果显示，在 SDS-PAGE 考染胶图中除 IgG 抗体的重链和轻链条带外，无肉眼可见的杂带，制备的腹水抗体纯度较高（图 3）。最终得到 1H2 抗体 52 mg，2A9 抗体 16 mg，3E1 抗体 13 mg。



M. 蛋白 Marker; 1. 纯化前 10 倍稀释的 1H2 腹水抗体蛋白; 2、3. 纯化后的 1H2 腹水抗体蛋白; 4. 纯化前 10 倍稀释的 2A9 腹水抗体蛋白; 5、6. 纯化后的 2A9 腹水抗体蛋白; 7. 纯化前 10 倍稀释的 3E1 腹水抗体蛋白; 8、9. 纯化后的 3E1 腹水抗体蛋白。

图 3 腹水抗体纯化效果检验

参照 HRP 酶标试剂盒说明书分别酶标上述制备的腹水抗体 320 μg，以 2 μg/mL Fiber-2 蛋白为包被原的 ELISA 方法测定上述酶标抗体效价，将 P/N 值 > 2.1 的最大稀释度作为酶标抗体效价。结果显示，除 HRP-1H2 的最大稀释度为 1 : 2 000 外，其余 2 株 HRP 酶标抗体的效价均为 1 : 32 000（表 2）。

表 2 3 株酶标单抗的效价

稀释比例	P/N 值		
	HRP-1H2	HRP-2A9	HRP-3E1
1 : 500	11.0	33.8	51.6
1 : 1 000	4.6	29.4	45.0
1 : 2 000	2.9	22.1	31.0
1 : 4 000	2.0	14.4	20.8
1 : 8 000	1.3	8.5	12.4
1 : 16 000	1.0	5.0	7.2
1 : 32 000	0.9	2.9	4.2

2.4 双抗体夹心 ELISA 方法反应程序的确定

经过一系列 ELISA 方法反应程序的优化，最终确定捕获单抗为 1H2，最佳检测单抗为 2A9（表 3）。捕获单抗的最佳包被浓度为 2 μg/mL，检测单抗的最佳稀释比例为 1 : 4 000（表 4）。捕获单抗的最佳包被条件为 4 °C 包被 14 h（图 4A），Fiber-2 抗原蛋白最佳作用条件为 37 °C 作用 1.5 h（图 4B），酶标检测抗体的最佳作用条件为 37 °C 作用 1 h（图 4C）；TMB 显色底物最佳反应时间为 37 °C 反应 10 min（图 4D）。

表 3 捕获单抗和检测单抗的筛选 (P/N 值)

检测单抗	捕获单抗		
	1H2	2A9	3E1
HRP-1H2	\	3.3	4.1
HRP-2A9	15.8	\	10.0
HRP-3E1	14.7	7.8	\

注：“\”表明 P/N 值 < 2.1 。

表 4 捕获单抗和酶标检测单抗的最适浓度

稀释比例	项目	1H2 抗体浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
		1	2	4	8
1 : 2 000	P 值	1.75	1.84	2.25	2.38
	N 值	0.06	0.06	0.05	0.05
	P/N 值	29.2	30.7	45.0	47.6
1 : 4 000	P 值	1.00	1.03	1.24	1.34
	N 值	0.05	0.05	0.05	0.05
	P/N 值	19.3	20.6	24.8	26.8
1 : 16 000	P 值	0.32	0.36	0.40	0.46
	N 值	0.06	0.06	0.06	0.06
	P/N 值	5.3	6.0	6.7	7.7
1 : 32 000	P 值	0.18	0.20	0.23	0.24
	N 值	0.06	0.06	0.06	0.05
	P/N 值	3.0	3.3	3.8	4.8

2.5 双单抗夹心 ELISA 方法的敏感性

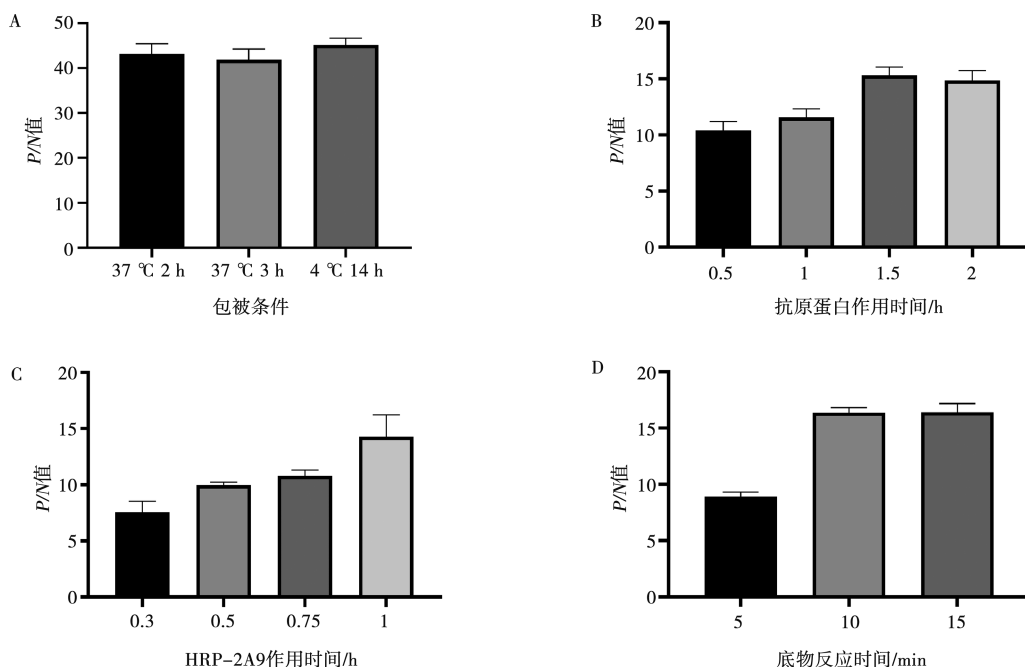
将纯化后的 Fiber-2 蛋白以 0.1% PBST 溶液进行 2 倍倍比稀释, 计算每稀释度的 P/N 值, 当 P/N 值 > 2.1 时判定结果为阳性。结果显示, 本研究建立的双单抗夹心间接 ELISA 方法的 Fiber-2 蛋白检测线为 0.078 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (表 5)。当 Fiber-2 蛋白浓度为 0.125 ~ 0.007 812 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 时, Fiber-2 蛋白浓度与 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值呈现良好的线性关系, R^2 为 0.986 8 (图 5), 说明该方法可以对 Fiber-2 蛋白浓度进行定量测定。

2.6 双抗体夹心 ELISA 方法的特异性

根据前述建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 按照 FAdV-4 Fiber-1、Fiber-2、Hexon、Penton base 蛋白及鸭腺病毒 3 型 Fiber-2 蛋白各 1 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 的检测量进行 ELISA 检测。结果显示, 所建立的 ELISA 方法除与 FAdV-4 的 Fiber-2 蛋白发生反应外, 与其余蛋白均不反应 (图 6)。

2.7 双抗体夹心 ELISA 方法的重复性

根据前述确定的双抗体夹心 ELISA 方法的反应程序测定所建立方法的重复性。结果显示, 该方法 4 次批内重复试验的变异系数在 1.5% ~ 5.1%, 5 次批间重复试验的变异系数在 2.6% ~ 7.8%, 均小于 10%, 重复性良好 (表 6、表 7)。



A. 包被条件筛选; B. 抗原蛋白作用时间筛选 (反应温度 37 °C); C. HRP 标记的 2A9 抗体作用时间筛选 (反应温度 37 °C); D. 底物反应时间筛选 (反应温度 37 °C)。

图 4 ELISA 反应程序相关条件的摸索

表 5 Fiber-2 蛋白的最低检测线

Fiber-2 蛋白浓度/ ($\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$)	$OD_{450 \text{ nm}}$ 值	P/N 值
2	1.73±0.047	30.5
1	1.60±0.026	28.3
0.5	1.50±0.090	26.4
0.25	1.42±0.128	25.2
0.125	1.03±0.114	18.2
0.0625	0.63±0.034	11.2
0.03125	0.39±0.044	6.9
0.015625	0.24±0.005	4.2
0.0078125	0.13±0.005	2.3
0.00390625	0.10±0.047	1.8
0 (阴性对照)	0.06±0.004	\

注：“\”表示无数值。

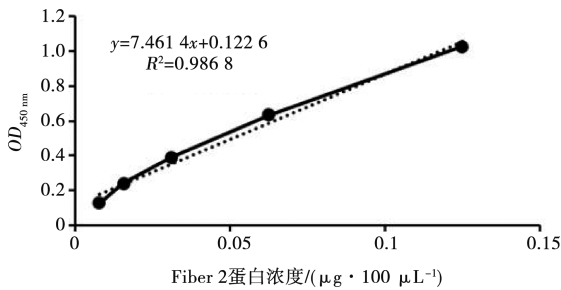


图 5 双抗体夹心 ELISA 方法检测 Fiber-2 蛋白浓度

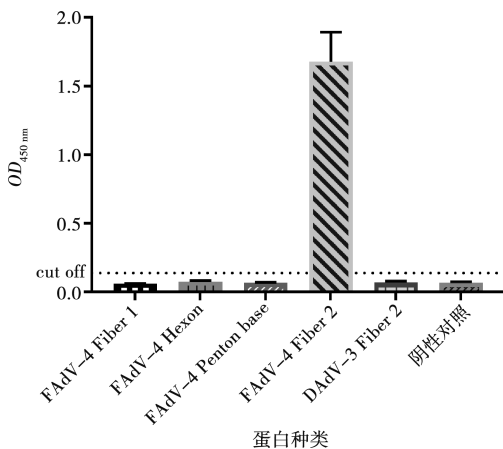


图 6 双抗体夹心 ELISA 的特异性试验

表 6 批内重复性试验

项目	$OD_{450 \text{ nm}}$ 值	变异系数/%
试验 1	1.41±0.07	5.1
试验 2	1.06±0.05	1.5
试验 3	1.15±0.04	3.9
试验 4	0.99±0.04	4.8

表 7 批间重复试验

项目	$OD_{450 \text{ nm}}$ 值	变异系数/%
试验 1	1.08±0.08	7.8
试验 2	1.02±0.04	4.0
试验 3	1.06±0.07	6.8
试验 4	1.04±0.02	2.8
试验 5	1.04±0.02	2.6

3 讨论

FAdV-4 因其高致死率和高传染性，给我国养鸡业带来了巨大的经济损失，因此，快速诊断方法的建立和疫苗的研发在 HHS 防控中起到十分重要的作用。快速、准确的病原诊断，疫苗的紧急免疫和治疗性产品（如卵黄抗体）的及时使用可以阻断疾病的传播，减少损失。ELISA 检测方法及其胶体金试纸条检测方法因其操作简便、对实验室设备要求低及灵敏度高等特点，广泛用于传染病病原诊断及抗体检测，因此，多项研究都建立了针对 FAdV-4 及其结构蛋白的 ELISA 检测方法。Shao 等^[28]以制备的 4A3 单抗为捕获抗体，HRP-3C2 单抗为酶标检测抗体建立了可以检测 Fiber-2 蛋白和 FAdV-4 病毒粒子的双抗体 ELISA 检测方法，该方法对 GST-Fiber-2 的最低检测线为 12.5 ng/mL，对 FAdV-4 的最低检测线为 1×10^3 TCID₅₀/mL。Xie 等^[29]以 Fiber-2 蛋白的单克隆抗体为基础，开发一种 FAdV-4 的胶体金试纸条诊断方法，该试纸条针对 GST-Fiber-2 蛋白的最低检测线为 0.1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ，对于 FAdV-4 的最低检测线为 1×10^5 TCID₅₀/100 μL 。虽然胶体金试纸条的灵敏度稍显逊色，但是其不需要酶标仪等实验室设备，更适用于养殖一线现场的快速检测。除采用单克隆抗体作为捕获抗体和酶标检测抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法外，还可以免源多抗作为捕获或检测抗体，如王乐铭等^[32]以制备单抗为捕获抗体，以兔多抗为检测抗体，HRP 酶标山羊抗兔抗体作为检测二抗建立的可以检测大片形吸虫组织蛋白酶 L1 的双抗体夹心 ELISA 方法；季文彬等^[33]以兔多抗包被 ELISA 板作为捕获抗体，以制备的单克隆抗体作为检测抗体，HRP 酶标山羊抗鼠抗体作为酶标检测二抗建立的可以检测传染性支气管炎病毒（IBV）的双抗体 ELISA 方法。

考虑到兔多抗的特异性不如单克隆抗体，为减少 ELISA 反应中的假阳性反应，本研究使用制备的单克隆抗体作为捕获抗体和酶标检测抗体建立了双抗体夹心 ELISA 方法。相关试验结果显示，本研究建立的双抗体夹心 ELISA 方法灵敏度高，对 His-Fiber-2 蛋白的检测线仅为 0.078 ng/ μL ，不与 FAdV-4 的其他

主要结构蛋白及鸭腺病毒 3 型的 Fiber-2 蛋白发生反应, 在 His-Fiber-2 蛋白浓度为 $0.125 \mu\text{g}/100 \mu\text{L} \sim 0.0078125 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 时, 蛋白浓度与 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值呈现良好的线性关系, 可以实现对 Fiber-2 蛋白浓度的定量检测, 且具有良好的重复性。对于亚单位疫苗的研制来说, 疫苗蛋白半成品溶液的蛋白浓度准确定量是保证疫苗免疫效果稳定的关键因素。一般而言, Fiber-2 蛋白浓度的定量多是通过 SDS-PAGE 检验蛋白纯度后, 根据测得的总蛋白浓度进行粗略推算^[34]。由于考马斯亮蓝染色法的灵敏度有限, SDS-PAGE 并不能准确反映出蛋白纯度, 且 SDS-PAGE 步骤繁琐、需要的仪器设备较多, 这些都限制了 Fiber-2 亚单位疫苗的进一步商业化。尽管这种粗略的定量方法可以满足实验要求, 但为了实现疫苗制备流程的简化, 提高疫苗免疫质量的稳定性, 本研究建立了可以定量检测 Fiber-2 蛋白浓度的双单克隆抗体 ELISA 方法。本方法敏感性好, 操作步骤更加规程化, 无需经过 SDS-PAGE 和总蛋白浓度测定即可实现对疫苗半成品溶液的精准定量检测, 为 Fiber-2 亚单位疫苗的商业化生产提供了有力工具。

遗憾的是, 本研究制备的 Fiber-2 蛋白单克隆抗体并没有体外中和活性, 这可能与 Fiber-2 蛋白不能诱导产生中和抗体有关。此外, 本研究建立的双抗体夹心 ELISA 可以检测到未稀释的阳性组织研磨上清液或感染细胞中的 FAdV-4, 在 FAdV-4 的临床抗原检测中有着一定的应用潜力, 但敏感性较差, 仅能检测到 $1 \times 10^{4.3} \text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$ 纯化 FAdV-4, 需要进一步的优化。这可能与单抗识别表位在 FAdV-4 病毒衣壳上的展示情况及两株单克隆抗体之间的识别表位空间位阻有关, 值得进一步探究。

4 结论

本研究以原核表达的 Fiber-2 蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 并通过特异性试验和抗体相加试验, 成功制备了 3 株特异性良好、可识别不同抗原表位的单克隆抗体 1H2、2A9、3E1, 并在此基础上建立了可以定量检测 Fiber-2 蛋白的双抗体夹心 ELISA 方法, 最低检测限为 $0.078 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 该方法特异性好、重复性好, 为 FAdV-4 亚单位疫苗研制提供了有力工具。

参考文献:

[1] HESS M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review [J]. Avian Pathol, 2000, 29 (3): 195-206.
[2] MEULEMANS G, COUVREUR B, DECAESSTECKER M, et al.

Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses [J]. Avian Pathol, 2004, 33 (2): 164-170.
[3] MASE M, NAKAMURA K, IMADA T. Characterization of fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens with hydropericardium syndrome based on analysis of the short fiber protein gene [J]. J Vet Diagn Invest, 2010, 22 (2): 218-223.
[4] KAJÁN G L, KECSKEMÉTI S, HARRACH B, et al. Molecular typing of fowl adenoviruses, isolated in Hungary recently, reveals high diversity [J]. Vet Microbiol, 2013, 167 (3/4): 357-363.
[5] GRAFL B, PROKOFIEVA I, WERNSDORF P, et al. Clinical signs and progression of lesions in the gizzard are not influenced by inclusion of ground oats or whole wheat in the diet following experimental infection with pathogenic fowl adenovirus serotype 1 [J]. Avian Pathol, 2015, 44 (3): 230-236.
[6] KISS I, HOMONNAY Z G, MATÓ T, et al. Research note: an overview on distribution of fowl adenoviruses [J]. Poult Sci, 2021, 100 (5): 101052.
[7] PAN Q, LIU L, GAO Y, et al. Characterization of a hypervirulent fowl adenovirus 4 with the novel genotype newly prevalent in China and establishment of reproduction infection model of hydropericardium syndrome in chickens [J]. Poult Sci, 2017, 96 (6): 1581-1588.
[8] YE J, LIANG G, ZHANG J, et al. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China [J]. Emerg Microbes Infect, 2016, 5 (5): e50.
[9] DHAR P, THAKUR A, ASRANI R K, et al. Protein profile of FAdV-4 based on SDS-PAGE and Western blot isolated from chickens in India [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2018, 58: 31-35.
[10] NICKLIN S A, WU E, NEMEROW G R, et al. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy [J]. Mol Ther, 2005, 12 (3): 384-393.
[11] HIERHOLZER J C. Adenoviruses in the immunocompromised host [J]. Clin Microbiol Rev, 1992, 5 (3): 262-274.
[12] RUSSELL W C. Adenoviruses: update on structure and function [J]. J Gen Virol, 2009, 90 (Pt 1): 1-20.
[13] TOOGOOD C I, CROMPTON J, HAY R T. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon [J]. J Gen Virol, 1992, 73 (Pt 6): 1429-1435.
[14] LIU Y, WAN W, GAO D, et al. Genetic characterization of novel fowl aviadenovirus 4 isolates from outbreaks of hepatitis-hydropericardium syndrome in broiler chickens in China [J]. Emerg Microbes Infect, 2016, 5 (11): e117.
[15] GAO J, ZHAO M, DUAN X, et al. Requirement of cellular protein CCT7 for the replication of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in leghorn male hepatocellular cells via interaction with the viral Hexon protein [J]. Viruses, 2019, 11 (2): 170.
[16] AZIZ F, TUFAIL S, SHAH M A, et al. In silico epitope prediction and immunogenic analysis for penton base epitope-focused vaccine against hydropericardium syndrome in chicken [J]. Virus Res, 2019, 273: 197750.
[17] WANG Z, ZHAO J. Pathogenesis of hypervirulent fowl adenovirus serotype 4: the contributions of viral and host factors [J]. Viruses, 2019, 11 (8): 741.
[18] EL BAKKOURI M, SEIRADAKE E, CUSACK S, et al. Structure of

- the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 short fibre [J]. *Virology*, 2008, 378 (1): 169-176.
- [19] PAN Q, WANG J, GAO Y, et al. Identification of chicken CAR homology as a cellular receptor for the emerging highly pathogenic fowl adenovirus 4 via unique binding mechanism [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9 (1): 586-596.
- [20] WANG W, LIU Q, LI T, et al. Fiber-1, not Fiber-2, directly mediates the infection of the pathogenic serotype 4 fowl adenovirus via its shaft and knob domains [J]. *J Virol*, 2020, 94 (17): e00954-20.
- [21] XIE Q, WANG W, LI L, et al. Domain in Fiber-2 interacted with KPNA3/4 significantly affects the replication and pathogenicity of the highly pathogenic FAdV-4 [J]. *Virulence*, 2021, 12 (1): 754-765.
- [22] SCHACHNER A, MAREK A, JASKULSKA B, et al. Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS) [J]. *Vaccine*, 2014, 32 (9): 1086-1092.
- [23] CHEN L, YIN L, ZHOU Q, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant fiber-2 protein in protecting SPF chickens against fowl adenovirus 4 [J]. *Vaccine*, 2018, 36 (9): 1203-1208.
- [24] RUAN S, ZHAO J, YIN X, et al. A subunit vaccine based on fiber-2 protein provides full protection against fowl adenovirus serotype 4 and induces quicker and stronger immune responses than an inactivated oil-emulsion vaccine [J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 61: 145-150.
- [25] HU J, LI G, WANG X, et al. Development of a subunit vaccine based on fiber2 and Hexon against fowl adenovirus serotype 4 [J]. *Virus Res*, 2021, 305: 198552.
- [26] YIN D, HE L, ZHU E, et al. A fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) Fiber2 subunit vaccine candidate provides complete protection against challenge with virulent FAdV-4 strain in chickens [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 263: 109250.
- [27] XIE Q, CAO S, ZHANG W, et al. A novel fiber-2-edited live attenuated vaccine candidate against the highly pathogenic serotype 4 fowl adenovirus [J]. *Vet Res*, 2021, 52 (1): 35.
- [28] SHAO H, WANG P, WANG W, et al. A novel monoclonal antibodies-based sandwich ELISA for detection of serotype 4 fowl adenovirus [J]. *Avian Pathol*, 2019, 48 (3): 204-208.
- [29] XIE S, ZHANG J, CHEN H, et al. Development of colloidal gold-based test strip for rapid detection of serotype 4 fowl adenovirus [J]. *J Virol Methods*, 2021, 296: 114231.
- [30] 陈雨晴, 曹洁, 王玉峰, 等. 1株禽4型腺病毒JS株的分离鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52 (5): 5.
- [31] 江雅, 牛季琛, 倪慧, 等. 一种检测乙型脑炎病毒抗体阻断ELISA的建立及其初步应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49 (9): 164-171.
- [32] 王乐铭, 王瑜瑞, 曾子轩, 等. 抗大片形吸虫 Cat L1 单克隆抗体的制备及其双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022 (2): 049.
- [33] 季文彬. 双抗体夹心 ELISA 检测传染性支气管炎病毒方法的建立 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [34] 刘世佳, 尚宵敏, 王浩, 等. 禽腺病毒血清4型 fiber-2 和 penton 蛋白亚单位疫苗初步研究及免疫效果评价 [J]. *中国兽医学报*, 2023, 43 (6): 1162-1166.